

Đánh giá hiệu quả bảo vệ chuột nhất trắng nhiễm khuẩn huyết của globulin kháng trực khuẩn mủ xanh

Lê Thu Hồng*; Phạm Ngọc Hùng*

TÓM TẮT

Đánh giá hiệu quả bảo vệ chuột nhất trắng nhiễm khuẩn huyết của globulin kháng trực khuẩn mủ xanh (TKMX). Kết quả cho thấy: khi bảo vệ bằng chế phẩm globulin kháng TKMX trước hoặc sau khi gây nhiễm khuẩn huyết (NKH), tỷ lệ chuột sống cao hơn nhóm chứng (100% chuột chết). Kết hợp globulin miễn dịch pha loãng 1/4 hay 1/2 với imipenem trên chuột nhất trắng NKH liều 4LD₅₀ đều cho kết quả chuột được bảo vệ tốt hơn so với nhóm chỉ sử dụng imipenem hay globulin đơn thuần (75 - 80% so với 35 - 45%), $p < 0,05$. Khi bảo vệ bằng globulin kháng TKMX pha loãng 1/2 đơn thuần hay kết hợp với imipenem, tỷ lệ chuột sống đều cao hơn nhóm sử dụng globulin pha loãng 1/4 đơn thuần hay kết hợp với imipenem. Tuy nhiên, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

* Từ khóa: Globulin; Trực khuẩn mủ xanh; Nhiễm khuẩn huyết.

Evaluation of protective effect of anti-pseudomonas aeruginosa globulin on white house mouse septicemia

SUMMARY

Evaluation protective effect on white house mouse septicemia of anti-P. aeruginosa globulin. The results showed that: when protected by anti-globulin before or after causing sepsis, the percentage of alive mice was higher than the control group (100% mice died). The combination of anti-P.aeruginosa globulin diluted 1/2 or 1/4 with imipenem on mice with sepsis 4LD₅₀ doses are to be protectively higher than just using imipenem or globulin alone (75 - 80% compared to 35 - 45%), with $p < 0.05$. When protected by anti-P.aeruginosa globulin diluted 1/2 alone or combine with imipenem, the percentage of alive mice was higher than the group using globulin diluted 1/4 alone or combine with imipenem. However, no difference was statistically significant with $p > 0.05$.

* Key words: Globulin; Pseudomonas aeruginosa; Septicemia.

* Bệnh viện 103

** Học viện Quân y

Phản biện khoa học: PGS. TS. Nguyễn Thái Sơn

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở Việt Nam, trong những năm gần đây, có một số công trình nghiên cứu về chế tạo

và ứng dụng vắc xin, huyết thanh miễn dịch kháng TKMX trong thực nghiệm [2, 3, 5]. Nhưng chế phẩm huyết thanh miễn dịch của đề tài nghiên cứu trước đây mới ở

dạng tẩm đắp để điều trị tại chỗ vết thương, vết bỏng nhiễm TKMX nên hiệu quả ứng dụng trong điều trị trên lâm sàng còn nhiều hạn chế, đặc biệt đối với bệnh nhân (BN) bị NKH. Thực tế cho thấy, số lượng BN bị NKH do loại vi khuẩn này tại các bệnh viện ngày càng gia tăng với tỷ lệ tử vong cao, việc tạo ra chế phẩm globulin miễn dịch kháng TKMX dạng tiêm để tạo ra hiệu quả tức thì, giảm nguy cơ tử vong là một việc làm hết sức cần thiết. Kế tục thành quả của những giai đoạn nghiên cứu trước đây về huyết thanh kháng TKMX, chúng tôi nghiên cứu "Đánh giá hiệu quả bảo vệ chuột nhất trắng NKH của globulin kháng TKMX".

ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

Chuột nhất trắng (200 con): khoẻ mạnh, trọng lượng 20 - 22 gram/con.

2. Vật liệu.

- Globulin kháng TKMX đã kiểm định cơ sở đạt yêu cầu.

- Nước muối sinh lý vô trùng 9‰.

- Môi trường, hóa chất để định danh vi khuẩn của hãng Bio-Rad (Pháp).

- Chủng 7P8 để gây NKH cho chuột nhất trắng (CNT), là chủng được lựa chọn làm kháng nguyên gây miễn dịch trên ngựa để tinh chế globulin miễn dịch. Chủng 7P8 được xác định nhạy cảm với imipenem (IM). LD_{50} của chủng 7P8 = $2,8.10^7$ vi khuẩn/ml [4].

3. Phương pháp nghiên cứu.

Gây NKH cho CNT bằng 1 liều $4LD_{50}$ chủng 7P8 qua đường tiêm ổ bụng, theo kỹ thuật của Schiller B (1985).

* *Xác định hiệu quả bảo vệ của globulin kháng TKMX trên CNT NKH với liều gây nhiễm $4LD_{50}$.*

- Sử dụng 1 liều 0,5 ml globulin kháng TKMX pha tỷ lệ 1/4 với nước muối sinh lý.

+ Nhóm 1: tiêm 0,5 ml globulin kháng TKMX sau 3 giờ gây NKH.

+ Nhóm 2: tiêm 0,5 ml globulin kháng TKMX 3 giờ trước khi gây NKH.

+ Nhóm 3 (nhóm chứng): chỉ tiêm $4LD_{50}$ chủng TKMX 7P8.

- Sử dụng 1 liều 0,5 ml globulin kháng TKMX pha tỷ lệ 1/2 với nước muối sinh lý

+ Nhóm 4: tiêm 0,5 ml globulin kháng TKMX sau 3 giờ gây NKH.

+ Nhóm 5: tiêm 0,5 ml globulin kháng TKMX 3 giờ trước khi gây NKH.

Theo dõi số chuột chết trong 48 giờ.

* *Xác định hiệu quả bảo vệ của globulin kháng TKMX trên CNT NKH khi kết hợp sử dụng kháng sinh:*

- Hiệu quả bảo vệ của globulin pha loãng 1/4 kết hợp với kháng sinh: imipenem (liều gấp 5 lần trên người) cho CNT theo đường tiêm ổ bụng ($550 \mu\text{l/ngày/lần/CNT}$ (0,55 ml) [1, 10].

+ Nhóm 6 (globulin + IM): gây NKH, 3 giờ sau tiêm globulin (0,5 ml/lần x 2 lần/ngày x 4 ngày) và IM (0,55 ml/lần x 2 lần/ngày x 4 ngày).

+ Nhóm 7 (globulin kháng TKMX đơn thuần): gây NKH, 3 giờ sau tiêm globulin kháng TKMX (0,5 ml/1 lần x 2 lần/ngày x 4 ngày).

+ Nhóm 8 (kháng sinh đơn thuần): gây NKH, 3 giờ sau tiêm IM (0,55 ml/lần x 2 lần/ngày x 4 ngày).

- Hiệu quả bảo vệ của globulin pha loãng 1/2 kết hợp với kháng sinh:

+ Nhóm 9 (globulin + IM): gây NKH cho CNT, 3 giờ sau tiêm globulin (0,5 ml/lần x 2 lần/ngày x 4 ngày) và IM (0,33 ml/lần x 2 lần/ngày x 4 ngày).

+ Nhóm 10 (globulin kháng TKMX đơn thuần): gây NKH, 3 giờ sau tiêm globulin kháng TKMX (0,5 ml/lần x 2 lần/ngày x 4 ngày).

Theo dõi số chuột chết trong 96 giờ.

* *Kỹ thuật cấy máu, phân lập TKMX:* tiến hành cấy máu CNT bị NKH. Mỗi nhóm cấy máu 1 con để phân lập TKMX (theo thường quy kỹ thuật vi sinh vật).

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

12 giờ sau khi gây nhiễm khuẩn 2 chủng TKMX độc lực, tiến hành cấy máu CNT. Mỗi nhóm thí nghiệm cấy máu đại diện 1 CNT. Kết quả cho thấy: vào thời điểm 24 giờ sau khi cấy máu, đã phân lập được TKMX ở tất cả CNT cấy máu. Các chủng TKMX phân lập được đều thuộc chủng 7P8.

1. Hiệu quả bảo vệ của globulin trên CNT NKH 4LD₅₀.

* *Hiệu quả bảo vệ của globulin pha loãng 1/4:*

Bảng 1: Hiệu quả bảo vệ của globulin pha loãng 1/4 trên CNT NKH chủng 7P8 liều 4LD₅₀.

NHÓM THỬ NGHIỆM	CÁCH THỨC THỬ NGHIỆM	n	SỐ CHUỘT CHẾT TÍCH LŨY		SỐ CHUỘT SỐNG	% CHUỘT SỐNG
			Sau 24 giờ	Sau 48 giờ		
1	Gây NKH 4LD ₅₀ : 3 giờ sau tiêm globulin 1/4	20	9	15	5	25,0
2	Tiêm globulin 1/4: 3 giờ sau gây NKH 4LD ₅₀	20	5	9	11	55,0
3	Chứng: gây NKH 4LD ₅₀	20	18	20	0	0,0

Khi gây NKH chủng 7P8 liều 4LD₅₀, 100% CNT trong nhóm chứng chết trong vòng 48 giờ đầu. Nhóm 2 được bảo vệ bằng chế phẩm globulin kháng TKMX pha loãng 1/4 với nước muối sinh lý trước khi gây NKH 3 giờ, tỷ lệ chuột sống cao hơn nhóm được bảo vệ sau khi gây NKH (55% so với 25% chuột sống) với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$).

* *Hiệu quả bảo vệ của globulin pha loãng 1/2:*

Bảng 2: Hiệu quả bảo vệ của globulin pha loãng 1/2 trên CNT NKH chủng 7P8 liều 4LD₅₀.

NHÓM THỬ NGHIỆM	CÁCH THỨC THỬ NGHIỆM	n	SỐ CHUỘT CHẾT TÍCH LŨY		SỐ CHUỘT SỐNG	% CHUỘT SỐNG
			sau 24 giờ	sau 48 giờ		
4	Gây NKH 4LD ₅₀ : 3 giờ sau tiêm globulin 1/2	20	6	14	6	30,0
5	Tiêm globulin 1/2: 3 giờ sau gây NKH 4LD ₅₀	20	4	7	13	65,0

Khi gây NKH chủng 7P8 liều 4LD₅₀, kết quả tương tự như bảng 1, tỷ lệ chuột sống ở nhóm 5 (dùng globulin miễn dịch trước gây NKH) cao hơn so với nhóm số 4 (được bảo vệ sau khi gây NKH). Tỷ lệ này là 65% so với 30%, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$). Như vậy, với độ pha loãng globulin khác nhau, việc sử dụng globulin miễn dịch sớm đều có hiệu quả bảo vệ tốt hơn dùng muộn.

Trên CNT gây NKH liều 4LD₅₀ khi sử dụng globulin miễn dịch sớm (dù globulin pha loãng 1/2 hay 1/4) đều cho hiệu quả bảo vệ tăng lên rõ rệt. Kết quả này tương đối phù hợp với nghiên cứu của Barekzi N.A (1999), khi sử dụng 10 mg IgG điều trị dự phòng 1, 3, 6 giờ trước khi công kích TKMX, tỷ lệ chuột sống sót 100%, trong khi tỷ lệ chuột sống sau khi công kích vi khuẩn 3 giờ là 80%, 6 giờ là 60% và nếu điều trị sau 18 giờ thì tỷ lệ chuột sống không có ý nghĩa so với nhóm chứng [7]. Việc điều trị sớm còn có ý nghĩa dự phòng NKH ở BN bồng. Theo Schiller B (1985): khi điều trị globulin miễn dịch kháng TKMX trên BN bồng (2 - 3 ngày sau bồng) làm giảm tỷ lệ

biến chứng gây NKH và rút ngắn thời gian ghép da. Pilz G (1991) điều trị globulin miễn dịch theo đường tiêm tĩnh mạch trên BN NKH, cho thấy: globulin miễn dịch giúp cải thiện nhanh triệu chứng lâm sàng, tỷ lệ tử vong ở nhóm điều trị thấp hơn nhóm chứng. Như vậy, globulin miễn dịch kháng TKMX dùng sớm trước khi gây NKH có ý nghĩa cho đối tượng có nguy cơ bị NKH do TKMX và là cơ sở để giảm thiểu nguy cơ tử vong ở những BN này.

2. Hiệu quả bảo vệ của globulin kháng TKMX trên CNT NKH chủng 7P8 liều 4LD₅₀ khi kết hợp sử dụng kháng sinh.

Để kháng sinh imipenem có hiệu quả bảo vệ trên CNT, cần phải tính liều lượng thích hợp đưa vào cơ thể CNT. Theo một số tài liệu và nghiên cứu khác, khi sử dụng kết hợp kháng sinh để đánh giá hiệu quả bảo vệ trên CNT gây NKH nên dùng liều gấp 3 và 5 lần trên người [1, 10]. Minukin V.V (1986) đã dùng huyết thanh hiệu giá 1/160 tiêm ổ bụng kết hợp với tobramycin liều gấp 3 lần liều trên người để điều trị CNT bị NKH [9]. Theo Oishi K (1992), khi kết hợp kháng thể đơn dòng đặc hiệu kháng TKMX (MAB)

liều 500 mg theo đường tiêm ổ bụng và sparfloracin 5 mg/kg cân nặng theo đường uống cho thấy, tác giả dùng liều kháng sinh gấp 5 lần liều trên người khi tiến hành trên chuột [10]. Do vậy, trong khuôn khổ đề tài,

chúng tôi đã sử dụng kháng sinh imipenem tiêm cho CNT liều gấp 5 lần trên người là 5,5 mg/ngày/CNT.

** Hiệu quả bảo vệ của globulin pha loãng 1/4 kết hợp với kháng sinh:*

Bảng 3: Hiệu quả bảo vệ của globulin pha loãng 1/4 kết hợp với kháng sinh trên CNT NKH chủng 7P8 liều 4LD₅₀.

NHÓM THỬ NGHIỆM	CÁCH THỨC THỬ NGHIỆM	n	SỐ CHUỘT CHẾT TÍCH LŨY				SỐ CHUỘT SỐNG	% CHUỘT SỐNG
			24 giờ	48 giờ	72 giờ	96 giờ		
6	Gây NKH 4LD ₅₀ : 3 giờ sau tiêm globulin 1/4 (0,5 ml/lần x 2 lần/ngày x 4 ngày) + IM (0,55 ml/lần x 2 lần/ngày x 4 ngày).	20	2	3	5	5	15	75,0
7	Gây NKH 4LD ₅₀ : 3 giờ sau tiêm globulin 1/4 (0,5 ml/lần x 2 lần/ngày x 4 ngày)	20	6	8	10	11	9	45,0
8	Gây NKH 4LD ₅₀ : 3 giờ sau tiêm IM (0,55 ml/lần x 2 lần/ngày x 4 ngày).	20	6	9	11	13	7	35,0
3	Chứng: NKH 4LD ₅₀ chủng 7P8	20	16	20			0	0

Ở nhóm 6 khi kết hợp sử dụng globulin pha loãng 1/4 với imipenem liều gấp 5 lần trên người sau 3 giờ công kích vi khuẩn độc lực gây NKH liều 4LD₅₀, tỷ lệ chuột sống cao hơn nhóm 7 (chỉ dùng globulin) và nhóm 8 (chỉ sử dụng imipenem), với tỷ lệ 75% so với 45% và 35%; cao hơn hẳn nhóm chứng (100% chuột chết), sự khác biệt có ý nghĩa

thống kê ($p < 0,01$). Akiyama M (2000), Felts A.G (2000) cho biết kết hợp globulin miễn dịch với kháng sinh có tác dụng làm giảm một cách có ý nghĩa số lượng TKMX sau khi gây NKH so với điều trị đơn thuần một loại [6, 8].

** Hiệu quả bảo vệ của globulin pha loãng 1/2 kết hợp với kháng sinh:*

Bảng 4: Hiệu quả bảo vệ của globulin pha loãng 1/2 kết hợp với kháng sinh trên CNT khi gây NKH chủng 7P8 liều 4LD₅₀.

NHÓM THỬ NGHIỆM	CÁCH THỨC THỬ NGHIỆM	n	SỐ CHUỘT CHẾT TÍCH LŨY				SỐ CHUỘT SỐNG	% CHUỘT SỐNG
			24 giờ	48 giờ	72 giờ	96 giờ		
9	Gây NKH 4LD ₅₀ : 3 giờ sau tiêm globulin 1/2 (0,5 ml/lần x 2 lần/ngày x 4 ngày) và IM (0,55 ml/lần x 2 lần/ngày x 4 ngày).	20	2	3	4	4	16	80,0
10	Gây NKH 4LD ₅₀ : 3 giờ sau tiêm globulin 1/2 (0,5 ml/lần x 2 lần/ngày x 4 ngày)	20	4	6	7	9	11	55,0

Tỷ lệ chuột sống ở nhóm 9 (dùng kết hợp globulin pha loãng 1/2 với imipenem gấp 5 lần liều người lớn) so với nhóm 10 (chỉ dùng globulin) và nhóm 8 chỉ dùng imipenem đơn thuần (80% so với 55% và 35%), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

KẾT LUẬN

Sau khi thử hiệu quả bảo vệ của globulin kháng TKMX trên CNT NKH do TKMX, chúng tôi rút ra kết luận:

1. Hiệu quả của globulin kháng TKMX trên CNT NKH chủng 7P8 với liều gây nhiễm 4LD₅₀.

- Tỷ lệ chuột sống ở các nhóm đ- ợc bảo vệ bằng chế phẩm globulin kháng TKMX 3 giờ khi gây NKH đều cao hơn các nhóm chuột đ- ợc bảo vệ sau NKH. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$).

- Khi bảo vệ bằng chế phẩm globulin kháng TKMX 3 giờ trước và khi sau gây NKH, tỷ lệ chuột sống đều cao hơn nhóm chứng (100% chuột chết) ($p < 0,01$).

- Khi bảo vệ bằng chế phẩm globulin kháng TKMX pha loãng 1/2 với nước muối sinh lý, tỷ lệ chuột sống cao hơn ở nhóm sử dụng globulin pha loãng 1/4. Tuy nhiên, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

2. Hiệu quả của globulin kháng TKMX kết hợp với imipenem trên CNT NKH chủng 7P8 với liều gây nhiễm 4LD₅₀.

- Kết hợp globulin miễn dịch pha loãng 1/4 hay 1/2 với imipenem trên CNT NKH liều 4LD₅₀ đều cho kết quả: chuột đ- ợc bảo vệ cao hơn so với nhóm chỉ sử dụng kháng sinh hay globulin đơn thuần (75 - 80% so với 35 - 45%), $p < 0,05$.

- Bảo vệ bằng chế phẩm globulin kháng TKMX pha loãng 1/2 với nước muối sinh lý kết hợp với kháng sinh imipenem, tỷ lệ chuột sống cao hơn ở nhóm sử dụng globulin pha loãng 1/4 kết hợp với kháng sinh. Tuy nhiên, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dược điển Việt Nam III. NXB Y học. Hà Nội. 2002, tr.221-240.
2. Hoàng Ngọc Hiến, Nguyễn Văn Việt và CS. Nghiên cứu quy trình chế tạo huyết thanh kháng TKMX dạng tẩm đắp để điều trị nhiễm khuẩn bông và ngoại khoa. Đề tài nhánh cấp Nhà nước. KHCN 11-12-01B. 1998.
3. Hoàng Ngọc Hiến và CS. Nghiên cứu tác dụng lâm sàng của huyết thanh kháng trực khuẩn mũ xanh từ ngựa để điều trị nhiễm khuẩn bông và ngoại khoa. Đề tài nhánh cấp Nhà nước. KHCN 11-12-01B. 2000.
4. Lê Thế Trung, Hoàng Ngọc Hiến. Nghiên cứu các týp huyết thanh, yếu tố dịch tễ học gây nhiễm khuẩn bông do TKMX và đề xuất các týp vi khuẩn dự tuyển để chế tạo vắc-xin. Đề tài cấp Bộ Y tế. 1999.
5. Nguyễn Văn Việt. Nghiên cứu chế tạo huyết thanh và gammaglobulin kháng *Pseudomonas aeruginosa* và đánh giá hiệu quả bảo vệ của các chế phẩm này trên động vật thí nghiệm. Luận án Tiến sỹ Khoa học Y - Dược. Hà Nội. 1996.

6. Akiyama M, Oishi K, Tao M, Matsumoto K, Pollack M. Antibacterial properties of *Pseudomonas aeruginosa* immunotype 1 lipopolysaccharide specific monoclonal antibody (MAb) in a murine thigh infection model: combined effects of MAb and ceftazidime. *Microbiol - Immunol.* 2000, 44 (8), pp.629-635.

7. Berekzi N. A, Poelstra K. A, et al. Efficacy of locally delivered polyclonal immunoglobulin against *pseudomonas aeruginosa* peritonitis in a murine model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1999, 43 (7), pp.1609-1615.

8. Felts A. G, Grainger D. W, Slunt J. B. Locally delivered antibodies combined with systemic antibiotics confer synergistic protection against antibiotic-resistant burn wound infection. *J Trauma.* 2000, 49 (5), pp.873-878.

9. Minukhin V.V, Tsyganenko A.I. Treatment of an infection due to the intraperitoneal inoculation of mice with *pseudomonas aeruginosa* with tobramycin and hyperimmune *pseudomonas aeruginosa* plasma used *per se* and in combination. *Antibiot Med Biotekhnol.* 1986, 31 (10), pp.778-781.

Oishi K, Sonoda F, Iwagaki A, et al. Effects of the combination of lipopolysaccharide-specific monoclonal antibodies and sparfloxacin against *pseudomonas aeruginosa* pneumonia in neutropenic mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992, 36 (7), pp.1352-1357.